

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16367

研究課題名（和文）患者大腸癌PDXを用いたオーダーメイド治療への架け橋

研究課題名（英文）A bridge to personalized treatment using patient-specific colorectal cancer PDX

研究代表者

岡澤 裕（Okazawa, Yu）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10794604

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、9例の大腸癌患者より原発癌を外科的に切除し癌オルガノイド培養を施行した。9例中8例において癌オルガノイドが樹立された。GFPやtomato蛍光蛋白質をコードする遺伝子をレンチウイルスを使用し、培養癌オルガノイドに導入することに成功しマウスへの移植実験の準備ができています。今後はGFP陽性大腸癌オルガノイドを用いたPDXモデルを用いて、薬剤の抗腫瘍効果の検討や転移の生物学的研究を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の大腸癌は、浸潤・転移や治療抵抗性を示す予後不良な癌である。しかしながらその悪性化の分子メカニズムの理解は十分ではなく、有効な治療法が限られている。本研究は、患者大腸癌サンプルを用いてPDXやオルガノイドを使用した患者個別化モデルを作製し、新規治療法の開発に役立てることに社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, primary cancer was surgically removed from nine colon cancer patients and cancer organoid culture was performed. Cancer organoids were established in eight of the nine cases. Genes encoding GFP and tomato fluorescent proteins were successfully introduced into cultured cancer organoids using lentivirus, and they are now ready for transplantation experiments into mice. In the future, we would like to use PDX models using GFP- and tomato-positive colon cancer organoids to examine the antitumor effects of drugs and conduct biological research on metastasis.

研究分野：腫瘍

キーワード：大腸癌 浸潤・転移 PDX オルガノイド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年増加傾向であり、2017年のがん死亡率においては2位となっている(男性3位、女性1位)。癌による死亡の最も大きな原因は肝臓や肺への遠隔転移であり、その治療の中心を担うのが抗癌剤である。しかし、抗癌剤の奏効率は50~60%程度であり、すべての患者に有効な治療とは言い切れない。

抗癌剤は癌細胞株を用いた動物実験により開発されている。しかし、動物実験で有効性が示されても、実際にヒトに投与する臨床試験では有効性が示されないことがある。実験に用いている癌細胞株は、長期間の培養により元の癌組織の特性が失われているため、抗癌剤の正確な治療効果を予測できない可能性がある。近年、ヒト癌組織を免疫不全マウスに移植し腫瘍を再現するPDXの利用が推進されている。PDXはヒト癌組織の特徴を保持できるため、抗癌剤の治療効果予測。従来の癌細胞株モデルで5%程度と言われる治療効果の予測能が、PDXマウスの場合は80%以上という報告がある。近年、国内においてもPDXの創薬利用が進み、PDXを活用した研究開発の実績が出始めている。

これまでにわれわれは、患者由来ヒト大腸癌組織を高度免疫不全 NOD/Shi-scid, IL-2R KO (NOG) マウスの皮下に移植し、皮下で増大した腫瘍塊を二次的に同所移植し、高率に肝臓や肺への転移を認められた PDX の作製に成功したことを報告した。実験的転移モデル作製のため、PDX から得られた腫瘍の懸濁液を脾臓に注射し、肝臓にマクロな転移巣を高率に形成したことを報告した。

さらに、浸潤から転移コロニー形成までの多段階の浸潤・転移のプロセスを可視化するために、レンチウイルス由来の GFP 発現ベクターが導入された大腸癌細胞オルガノイドを樹立した。GFP 陽性大腸癌オルガノイドが同所移植された PDX モデルでは、GFP 陽性癌細胞が肝臓や肺で多数検出され、可視化された患者大腸癌の自発的肺転移モデルとなりえることがわかった。そこで本研究成果を発展させ、患者由来大腸癌から作製した同所移植モデルや実験的転移モデルを用い抗癌剤感受性試験を行い、奏効率の高い抗癌剤を患者個別に選択することができるかを検証するのが狙いである。さらには、抗腫瘍効果が期待される未承認の新薬についても同様に感受性試験を行うことができ、新たな治療薬を発見する可能性も有していると考え。また、in vivo の実験だけでなく、樹立した大腸癌細胞オルガノイドを用いて in vitro での抗癌剤感受性試験や癌の浸潤・転移のメカニズムも同時に検証することができる。

2. 研究の目的

患者癌移植モデル(以下、PDX)は患者癌の特徴を反映した前臨床モデルとして期待されているが、転移形成率が非常に低いことより、抗転移薬の開発や浸潤・転移の研究が困難であった。これまで申請者らは実験的転移モデルの作製のため、9症例の患者から採取した大腸癌細胞を高度免疫不全 NOD/Shi-scid, IL-2R KO (NOG) マウスの脾臓へ注入し、7例で肝臓にマクロな転移巣を形成した。さらに、浸潤から転移コロニー形成までの多段階の浸潤・転移のプロセスを可視化するために、レンチウイルス由来の GFP 発現ベクターが導入された大腸癌細胞オルガノイドを樹立し、浸潤・転移にかかわる細胞動態を蛍光顕微鏡下で観察した。GFP 陽性大腸癌オルガノイドが同所移植された PDX モデルでは、GFP 陽性癌細胞が肺で多数検出され、可視化された患者大腸癌の自発的肺転移モデルとなりえることがわかった。今後は GFP 陽性大腸癌オルガノイドを用いた PDX モデルを用いて、薬剤の抗腫瘍効果の検討や転移の生物学的研究を進めていきたい。

3. 研究の方法

本研究で患者大腸癌細胞を用いた薬剤感受性試験と癌の浸潤・転移形式を解明するために3つの項

目を設定する。

1) 作製した実験的転移モデル、同所移植転移モデルを用い in vivo と in vitro での抗癌剤感受性試験を施行する

すでに申請者らは 3 例の GFP 陽性患者大腸癌オルガノイドを樹立し、実験的転移モデル、同所移植モデルを作製した。抗癌剤感受性試験に用いる抗癌剤は、現在大腸癌治療の key drug とされている、Fluorouracil、Oxaliplatin、Irinotecan とする。実験的転移モデルマウスでは腹腔内に抗癌剤を投与し、肝臓の転移巣の大きさを蛍光顕微鏡で観察し判定する。同所移植モデルマウスでは抗癌剤を腹腔内に投与し、原発巣の腫瘍縮小率を測定するとともに、肝臓や肺への転移巣の有無や大きさを判定する。In vitro の実験では、大腸癌細胞オルガノイドの培養 well の中に各種抗癌剤を添付し、細胞増殖スピードを顕微鏡で観察する。また、化合物ライブラリを使用して high-throughput screening を施行する。

2) 実臨床と本研究結果の比較検討をする

上記の研究で得られた結果が実臨床での抗癌剤の抗腫瘍効果と一致しているのかを検証する。癌組織は heterogenetic であるが、研究用に採取された組織片はごく一部であるため、PDX から作製された大腸癌細胞オルガノイドや転移モデルマウスが臨床の状態を完全に模倣しているとは限らない。臨床検体と PDX の腫瘍学的な同一性に関しては、免疫組織染色などで確認する。

3) 転移したモデルと転移しなかったモデルの腫瘍学的な違いを探求する

上記の研究結果に基づくことになるが、肝臓や肺に全く転移を起こさなかった転移モデルマウス症例と、非常に多くの転移を認めた転移モデルマウス症例が存在すると思われる。その両者の腫瘍学的な違いが何なのかを検証する。癌の浸潤・転移のメカニズムとして、上皮系の形態を持った癌細胞集団の一部が、間葉系形態を持った単一細胞に変化し、癌浸潤・転移が促進される上皮間葉移行が広く知られている。また、近年では上皮系の形態を維持したままの癌細胞クラスターが、効率的に転移に寄与するという理論も支持されている。しかし、癌細胞が単一の細胞で浸潤・転移するのか、あるいはクラスターを形成し浸潤・転移するのか、さらには上皮間葉移行と癌細胞クラスターがどのようにかかわっているのかは癌の浸潤・転移過程の大きな謎であった。そこで、われわれはこれまで患者大腸癌組織片を高度免疫不全マウスに同所移植したモデルマウスで、PDX 由来大腸癌の浸潤・転移様式を調べてきた。それにより、中間型上皮間葉移行を介した E/M type 癌細胞集団が患者大腸癌の転移形成に寄与している可能性が示唆された。本研究ではさらに、原発巣由来癌細胞と比較して転移巣由来癌細胞で発現の亢進している遺伝子のリストを作成する。各症例で共通に発現が亢進している遺伝子あるいは症例間で特異的に発現が亢進している遺伝子の有無を調査し以下の機能解析を施行する。3~4 種の候補遺伝子を調査し、1~2 種の標的遺伝子の同定を目指す。対照の GFPshRNA を挿入した癌細胞と比較して、shRNA を用いて候補遺伝子の発現が抑制された癌細胞が転移能を減弱しているか否か調査する。原発巣の大きさに対する転移巣の GFP 陽性シグナル強度にて転移形成能を評価する。各転移巣由来大腸癌細胞において、上記で同定された標的遺伝子の mRNA の発現量の抑制効果を指標にして、350 種類の被験物質を 24 時間添加するスクリーニングを予定している。1 標的遺伝子あたり 2~3 種の被験物質の同定を予定している。その癌転移抑制薬としての効果は、上記ヒト大腸癌転移モデルマウスを使用した臨床試験により調査する。

4. 研究成果

本研究では、9 例の大腸癌患者より原発癌を外科的に切除し癌オルガノイド培養を施行した。9 例中 8 例において癌オルガノイドが新規に樹立された。癌オルガノイドは stock し回復してもよく増殖し実験

に使用できることが分かった。

GFP や tomato 蛍光蛋白質をコードする遺伝子をレンチウイルスを使用し、培養癌オルガノイドに導入することに成功しマウスへの移植実験の準備ができている。今後は GFP や tomato 陽性大腸癌オルガノイドを用いた PDX モデルを用いて、薬剤の抗腫瘍効果の検討や転移の生物学的研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchiya Y, Momose H, Kure K, Ro H, Takahashi R, Okazawa Y, Kawai M, Takahashi M, Kojima Y, Sakamoto K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Case of Incarcerated Femoral Hernia Treated with Laparoscopic Surgery after Groin Hernia Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Rep Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000509950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Koyama Y, Sulidan K, Komiyama H, Saeki H, Ohtsuji N, Ito Y, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K*, Orimo A.	4. 巻 146
2. 論文標題 Metastatic seeding of human colon cancer cell clusters expressing the hybrid epithelial/mesenchymal state.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2547-2562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.32672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤祐子, 目澤義弘, 阿部雅明, 陳 経権, 水越幸輔, 岡澤 裕, 坂本一博, 折茂 彰
2. 発表標題 ヒト大腸癌オルガノイドと繊維芽細胞のマウス共移植モデルによる実験的CAFsの作製
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------